

PCT
 ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
 Oficina Internacional
 SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)



(51) Clasificación Internacional de Patentes⁶: C07K 16/30, A61K 39/395, 51/10, G01N 33/574, 33/577, C07K 16/46	A1	(11) Número de publicación internacional: WO 97/33916 (43) Fecha de publicación internacional: 18 de Septiembre de 1997 (18.09.97)
(21) Solicitud Internacional: PCT/CU97/00002		<p style="margin-top: 0;">dad Habana 11100 (CU). VAZQUEZ LOPEZ, Ana María [CU/CU]; Calle Mayía Rodríguez No. 455 entre Carmen y Patrocinio, Víboras, 10 de Octubre, Ciudad Habana 10500 (CU). TORMO BRAVO, Blanca Rosa [CU/CU]; Avenida 31 No. 32009 entre 320 y 322, Reparto Juan de Dios Fraga, La Lisa, Ciudad Habana 13500 (CU). OLIVA GONZALEZ, Juan Perfecto [CU/CU]; Calle Ayesterán No. 198, Apartamento 2B entre 19 de Mayo y Desaguadero, Cerro, Ciudad Habana 10600 (CU). RODRIGUEZ MESA, Nelson Víctor [CU/CU]; Avenida 222 Edificio 2723 Apartamento 17 entre 27A y 29, La Coronela, La Lisa, Ciudad Habana 13600 (CU). LOMBARDERO VALLADARES, Josefina [CU/CU]; Calle Agustina No. 70 entre San Miguel y Langueruela, La Víboras, 10 de Octubre, Ciudad Habana 10700 (CU). MATHEO DE ACOSTA DEL RIO, Cristina [CU/CU]; Calle C No. 95 entre 6 y 10, Altahabana, Boyeros, Ciudad Habana 10800 (CU).</p>
(22) Fecha de la presentación internacional: 12 de Marzo de 1997 (12.03.97)		
(30) Datos relativos a la prioridad: <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> 32/96 12 de Marzo de 1996 (12.03.96) CU </div>		
(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CIM) [CU/CU]; Calle 216 y 15, Atabey, playa, Ciudad Habana 12100 (CU).		
(72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): IZNAGA ESCOBAR, Normando Enrique [CU/CU]; Avenida 31 No. 32005 entre 320 y 322, Reparto Juan de Dios Fraga, La Lisa, Ciudad Habana 13500 (CU). MORALES MORALES, Alejo Antonio [CU/CU]; Calle Santa Felicia No. 426, Apartamento 4 entre Melones y Rosa Enríquez, Luyano, 10 de Octubre, Ciudad Habana 13200 (CU). NUÑEZ GANDOLFF, Gilda [CU/CU]; Calle Martí No. 356 entre 27 de Noviembre y Aranguren, Regla, Ciudad Habana 11200 (CU). RAMOS ZUZARTE, Mayra [CU/CU]; Calle Apodaca No. 428 entre General Roloff y Fray Alonso, Guanabacoa, Ciud		
(74) Mandatario: MORENO SAMPER, Olga Lidia; Lex, S.A., Avenida 1ra No. 1001, Esquina 10, Miramar, Playa, Ciudad Habana 11300 (CU).		
(81) Estados designados: BR, CA, CN, JP, MX, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		

Publicada

*Con informe de búsqueda internacional.
 Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.*

(54) Title: MONOClonal antibodies ior C5 for the diagnosis and treatment of colorectal tumors

(54) Título: ANTICUERPOS MONOCLONALES IOR C5 PARA EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE TUMORES COLOR-RECTALES

(57) Abstract

The present invention relates to the field of nuclear medicine and in particular to the application of the monoclonal antibody ior C5 for the diagnosis and therapy of colorectal tumors, their metastases and recurrences. To this effect, the present invention provides a composition which contains monoclonal antibodies which recognize the antigen ior C2 and a weak ligand with the reducer agent Sn²⁺ in order to transfer Tc-99m, Re-186, Re-188 and analogs thereof, said composition being useful for the diagnosis by immunogammagraphy and radioimmunotherapy of colorectal tumors, metastases and recurrences.

(57) Resumen

La presente invención se relaciona con la rama de la Medicina Nuclear y en particular con la aplicación del anticuerpo monoclonal ior C5 para el diagnóstico y terapia de tumores colorrectales, sus metástasis y recidivas. Para ello la presente invención proporciona una composición que contiene anticuerpos monoclonales que reconocen el antígeno ior C2 y un ligando débil con el agente reductor Sn²⁺ para realizar la transferencia del Tc-99m, Re-186, Re-188 y sus similares, útil para el diagnóstico por inmunogammagrafía y radioinmunoterapia de tumores colorrectales, metástasis y recidivas.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AM	Armenia	GB	Reino Unido	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	México
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Níger
BB	Barbados	GR	Grecia	NL	Paises Bajos
BE	Bélgica	HU	Hungría	NO	Noruega
BF	Burkina Faso	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelanda
BG	Bulgaria	IT	Italia	PL	Polonia
BJ	Benín	JP	Japón	PT	Portugal
BR	Brasil	KR	Kenya	RO	Rumania
BY	Belarús	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CA	Canadá	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CF	República Centroafricana	KR	República de Corea	SE	Suecia
CG	Congo	KZ	Kazajistán	SG	Singapur
CH	Suiza	LI	Liechtenstein	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lituania	SZ	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	LU	Luxemburgo	TD	Chad
CZ	República Checa	LV	Letonia	TG	Togo
DE	Alemania	MC	Mónaco	TJ	Tayikistán
DK	Dinamarca	MD	República de Moldova	TT	Trinidad y Tabago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ucrania
ES	España	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finlandia	MN	Mongolia	US	Estados Unidos de América
FR	Francia	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistán
GA	Gabón			VN	Viet Nam

ANTICUERPOS MONOCLONALES IOR C5 PARA EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE TUMORES COLORRECTALES.

Sector Técnico

5 La presente invención se relaciona con la rama de la Medicina Nuclear y en particular proporciona un reactivo y una composición farmacéutica que contienen anticuerpos monoclonales útiles en el marcaje con isótopos radioactivos para el diagnóstico y la terapia de neoplasias malignas.

Técnica anterior

10 La utilización de radioisótopos para el marcaje de anticuerpos monoclonales (AcMs) es bien conocida. Estas composiciones pueden ser administradas a los humanos para visualizar o monitorear el funcionamiento de varias partes del cuerpo o para determinar la presencia y localización de determinados antígenos, anticuerpos, hormonas y sus
15 similares.

También pueden ser utilizadas para el tratamiento de determinados estadios de la enfermedad. Tradicionalmente para estos propósitos se han utilizado una variedad de radionúclidos que incluyen isótopos del Iodo, Indio, Tecnecio y el Renio. Además se conoce que las proteínas pueden ser
20 marcadas con Tc-99m y sus análogos para formar un compuesto que es utilizado para el diagnóstico por imágenes.

Entre los isótopos más utilizados en Medicina Nuclear el Tc-99m es el más apropiado para aplicaciones en el diagnóstico por imágenes, debido a sus excelentes propiedades como radionúclido (Energía de emisión gamma E = 140 Kev, Tiempo de vida media $T^{1/2} = 6.02$ horas), así como, su fácil disponibilidad al obtenerse a partir de un generador de molibdeno-99 (Mo99) en forma de perteconetato sódico (NaTcO_4). El perteconetato se mezcla con un agente reductor, como el fluoruro estanoso (SnF_2) con el objetivo de reducir al Tc-99m del estado de oxidación 7^+ , a estados de oxidación 3^+ , 4^+ o 5^+ en
30 presencia de la proteína que ha de ser marcada con el radioisótopo.

Existen dos vías fundamentales para el marcaje de AcMs con Tc-99m: una es la vía indirecta mediante la cual el Agente Quelante Bifuncional (AQBF) se une a la proteína a través de un grupo funcional (en los residuos de lisina y arginina de las cadenas peptídicas) y el Tc-99m se acopla a través del otro grupo funcional o grupo del quelato (Krejcarek G. E. y Tucker K. L., Bioch. and Biophys. Res. Commun. 77, pág. 581-585, 1977).

Otros métodos han sido descritos por diferentes autores (Patentes US No. 4 668 503; US No. 4 479 930 y US No. 4 670 545; Baidoo K. E. et al, Cancer Res. (Suppl.) 50, pág. 799s-803s, 1990).

Todos los AQBF tienen sus limitaciones, dentro de las que se incluyen, la complejidad del procedimiento de radiomarcaje, el tiempo que se requiere para acomplejar el radioisótopo y la introducción y presencia de sustancias que pueden afectar la integridad, estabilidad y reconocimiento inmunológico de la proteína.

La otra vía es la de marcaje directo, que consiste en utilizar un agente reductor (SnCl_2 , 2-mercaptoetanol (2-ME), ditiotreitol (DTT), ácido ascórbico (AA) y sus similares) para reducir los puentes disulfuros de los residuos de cisteína de la proteína a grupos sulfidrilos (SH), los cuales se conjugan relativamente fácil al Tc-99m debido a su alta capacidad de formar complejos de coordinación.

El primer método directo capaz de lograr una unión fuerte entre la proteína y el Tc-99m para aplicaciones "in vivo" fue el método de pre-estañamiento (Patente US No. 4 424 200). En este método los AcMs se tratan con SnCl_2 en presencia de sales de ftalato y tartrato (pH 5.6) durante 21 horas en atmósfera de nitrógeno gaseoso.

La solución antes mencionada se utiliza para reducir los AcMs y por consiguiente exponer los grupos SH reactivos; para proteger los grupos SH reactivos de los AcMs reducidos y prevenir la reformación de los puentes disulfuros; reducir el pertecnetato sódico y acomplejar el Tc-99m reducido y transferirlo a los sitios de unión de los grupos SH en los AcMs reducidos.

Otros autores reducen los puentes de disulfuro de los AcMs con monotioles como el 2-ME o 2-mercaptopropilamina (2-MEA) (Schwarz A. y Steinstrasser A., Journal of Nuclear Medicine 28, p. 721, 1987; Solicitud de Patente Europea No. EP 0 271 806 A2). En estas publicaciones utilizan el 5 Sn^{2+} para reducir el perteconato y el Tc-99m reducido lo complejan con ligandos débiles como los fosfonatos o pirofosfatos, que son los encargados de transferir el Tc-99m a los sitios de alta afinidad del anticuerpo.

Una variante modificada del método fue publicada por Mather S. J. y Ellison D. ("Reduction mediated Technetium-99m labeling of Monoclonal 10 antibodies". J. Nucl. Med. 31, pág. 692-697, 1990).

Algunos autores utilizan DTT para reducir los puentes disulfuros del AcM, posteriormente protegen los grupos SH reactivos con Zn^{2+} y otros reactivos que son derivados de grupos sulfidrilos y utilizan sales de tartrato para complejear y transferir el radionúclido reducido a los sitios de unión 15 del monoclonal (Patente US No. 4 877 868; Solicitud de Patente Europea No EP 0 237 150).

Otros estudios han sido realizados por este método y en los mismos se utilizaron DTT para reducir los anticuerpos y como complejantes sales de tartrato o glucoheptonato y sus análogos (Pak K. Y. et al, J. Nucl. Med. 30, 20 pág. 793, 1989; Solicitud Internacional PCT WO 88/07382).

También ha sido utilizado el ácido ascórbico (AA) para reducir los AcMs a una relación molar de 3500 : 1 (AA : AcM). En este trabajo utilizaron soluciones de ditionita sódica ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) burbujeada con nitrógeno para reducir el perteconato y transferirlo a los sitios de unión de los AcMs 25 reducidos alcanzándose eficiencias de marcaje mayores de 95% (Thakur M. L. et al, Nuclear Medicine Biology 18, pág. 227-233, 1991).

Todos los métodos directos de marcaje antes mencionados son ampliamente utilizados en la actualidad debido a que evitan la conjugación de los AcMs con los AQBF como sucede en los métodos indirectos, la 30 reducción es controlada con facilidad, no hay pérdida de la inmunoreactividad de la molécula por su ligando, puede ser adaptable a

procedimiento de marcaje instantáneo y se alcanza una eficiencia de marcaje elevada 95%.

De todos los métodos directos de marcaje, la metodología basada en el uso de 2-ME para el radiomarcaje cuantitativo de AcMs con Tc-99m sin 5 pérdidas en la integridad de la molécula, ni en su actividad biológica ha sido bien documentada y actualmente es la más apropiada para estudios clínicos (Baum R. P. et al, Nucl. Med. Communications 10, pág. 345-352, 1989).

Han sido probadas diferentes formas de tratamiento del carcinoma colorectal siendo la resección quirúrgica del tumor la única que ha resultado 10 curativa. La cirugía permite alcanzar altos porcentajes de sobrevida en los casos que son detectados tempranamente, pero desafortunadamente la mayoría de los casos son diagnosticados en etapas en las que el tumor ya ha hecho metástasis.

Actualmente la estrategia a seguir para aumentar la sobrevida general 15 ante la enfermedad abarca el diagnóstico, la terapéutica y la epidemiología. Los investigadores están evaluando métodos que permitan diagnosticar precozmente la enfermedad, o sea, en estados en que aún no se haya producido la diseminación hacia las capas más externas del órgano, etapas en las que aún es quirúrgicamente curable. De la misma forma el 20 conocimiento de los factores epidemiológicos y el desarrollo de nuevos métodos terapéuticos más eficaces contribuirán al incremento de la sobrevida.

El uso de anticuerpos monoclonales (AcMs) marcados con isótopos radioactivos para la detección del cáncer por métodos 25 inmunogammagráficos ha centrado la atención en los proyectos de investigación de los últimos años. Los AcMs han mostrado potencial suficiente para servir como portadores de radioisótopos y dirigirlos hacia los antígenos tumor asociados.

La utilización de composiciones con anticuerpos marcados con isótopos 30 radioactivos, los cuales emiten radiaciones en niveles que pueden ser detectadas después de ser administradas en humanos es bien conocido

(Mach J. P. et al, Sem. in Nucl. Med. 19, pág. 262-281, 1989; Behr T. M. et al, J. Nucl. Med. 36, pág. 430-441, 1995). Estas composiciones son utilizadas para visualizar y monitorear el funcionamiento de varias partes del cuerpo humano o son utilizadas en el diagnóstico para determinar la presencia o ausencia de determinados抗igenos, anticuerpos, hormonas y sus similares.

Algunos anticuerpos radiomarcados han sido utilizados para detectar tumores que están asociados con el antígeno carcinoembrionario (CEA). Los anticuerpos contra el CEA marcados con I-131 o I-125 son utilizados para detectar tumores que producen CEA o están asociados con este marcador (Patentes US No. 3 663 684, US No. 3 867 363 y US No. 3 927 193). También se conoce que los AcMs pueden ser marcados con Tc-99m con el objetivo de conformar agentes para el diagnóstico "*in vivo*".

Los AcMs ior C5, anticuerpos de origen murino de isotipo IgG1 generados a partir de la inmunización de ratones Balb/c con la línea celular de cultivo humana SW1116 (adenocarcinoma colorrectal) y la fusión de los esplenocitos del ratón seleccionado con la línea de mieloma murino no secretora SP 2/O Ag14 (Vázquez A. M. et al, Hybridoma 11, pág. 245-256, 1992), reconocen un antígeno expresado preferencialmente en la superficie y citoplasma de células colorrectales malignas y normales. No reconocen a los antígenos CEA, Lewis a, Lewis b, Lewis a sialilado, ni a los antígenos de membrana de las células mononucleares periféricas, ni de los glóbulos rojos.

Estudios de western blotting utilizando extractos de membrana de la línea SW1116 mostraron que estos AcMs reconocen un complejo glicoproteico al que se denominó ior C2, compuesto por una banda mayor de 145 KDa y una menor de 190 KDa (Vázquez A. M. et al, Year Immunol., Basel, Karger, vol. 7, pág. 137-145, 1993).

Estos AcMs reconocen en tejidos humanos normales determinantes epiteliales de distribución restringida que están predominantemente expresados en el canal alimentario y sus derivados embriológicos. Reconocen además todas las vellosidades intestinales, en el intestino grueso

el patrón es homogéneo y en pulmón reconoce los bronquios (marcaje del epitelio respiratorio pseudoestratificado ciliado y marcaje de células caliciformes).

La inmunotinción de las células de la mayoría de las glándulas de los adenocarcinomas del colon, varía marcadamente en intensidad dentro del mismo tumor, resultando en un patrón de marcaje inmunohistoquímico heterogéneo. El marcaje es apical y en general marca el mucus de las células caliciformes y el material secretado intraluminalmente.

El marcaje positivo y la identificación del antígeno por métodos de western blotting e inmunohistoquímicos en un grupo heterogéneo de células cancerígenas, su marcaje heterogéneo en los tejidos de adenocarcinomas colorrectales y su expresión homogénea en la mucosa normal en estudios realizados "in vitro" sugieren que:

- a) el antígeno en cuestión es único y que es sintetizado por las células malignas de colon
- b) puede ser utilizado para el diagnóstico de tumores colorrectales, metástasis y recidivas por métodos inmunogammagráficos.

Mientras que el marcaje de los anticuerpos ior C5 con peroxidasa y con fluoresceína son muy efectivos para la identificación y localización de células tumorales "in vitro", estas composiciones marcadas no son apropiadas para uso "in vivo" debido a que no permiten la visualización por ninguno de los sistemas de detección existentes que utilizan métodos inmunogammagráficos y por consiguiente, no tienen un amplio uso ya que están simplificados sólo a técnicas inmunohistoquímicas que requieren de microscopio óptico o electrónico, para la identificación positiva de las muestras de biopsias.

Otra de las posibles consecuencias desfavorables que aparecen con los antígenos tumor asociados, es que al utilizar anticuerpos monoclonales radiomarcados, donde éstos se unen directamente a las células tumorales que expresan este antígeno pueden obtenerse imágenes imperfectas debido a la baja sensibilidad de las células tumorales, ya que el anticuerpo

frecuentemente tiene un número limitado de sitios de unión. De este modo, la célula solamente puede ser capaz de acomodar una molécula de anticuerpo radiomarcado en un sólo sitio antigénico. Así, la densidad de moléculas radiomarcadas en la superficie de la célula puede no ser suficiente para distinguir la célula tumoral del resto de las células en los tejidos, debido a la baja especificidad.

Hasta el momento actual no se ha reportado ningún estudio en el que se describa la localización del antígeno ior C2 en las células tumorales, metástasis y/o recidivas por métodos inmunogammagráficos fundamentalmente, utilizando anticuerpos monoclonales contra este antígeno, marcados con Tc-99m, Re-186, Re-188 y sus similares.

La novedad de la presente invención consiste en proporcionar una composición que contiene anticuerpos monoclonales que reconocen el antígeno tumor asociado ior C2, en particular, los anticuerpos monoclonales ior C5, así como sus variantes químéricas y humanizadas, y un ligando débil con el agente reductor Sn²⁺ para realizar la transferencia de los radiomarcadores Tc-99m, Re-186, Re-188 y sus similares. Dicha composición es útil para la radioinmunoterapia y el diagnóstico por inmunogammagrafia de tumores colorrectales, metástasis y recidivas.

Además, con los datos obtenidos a partir de estudios realizados "in vivo" se demuestra que el patrón de biodistribución del antígeno C2 observado en humanos con la composición de la presente invención es diferente al reportado en estudios anteriores *in vitro* empleando los anticuerpos monoclonales ior C5 (Vázquez A. M. et al, Year Immunol., Basel, Karger, vol. 7, pág. 137-145, 1993). En estos estudios se había observado la presencia de dicho antígeno tanto en células normales como en células malignas. Con el empleo de la composición de la presente invención se logra una distinción selectiva de las células afectadas en relación a las células normales, ya que sólo son radiomarcadas las células malignas lo que hace presumir una localización intracitoplasmática de dicho antígeno en las células normales y superficial en el caso de las células malignas. Este hallazgo hace a la

presente solución técnica muy útil para su empleo en métodos de detección "in vivo" empleando técnicas inmunogammagráficas.

Divulgación de la Invención

1. Obtención del AcMs.

5 Los AcMs ior C5 son anticuerpos de origen murino con alta especificidad, de isotipo IgG1 que reconocen al antígeno C2 altamente expresado en la superficie y en el citoplasma de las células colorrectales normales y malignas respectivamente. Los AcMs ior C5 fueron obtenidos por la inmunización de ratones Balb/c con la linea celular de cultivo humana
10 SW1116 (adenocarcinoma colorrectal) y la fusión de los esplenocitos del ratón seleccionado con la línea de mieloma murino no secretora SP 2/O Ag14. Su generación, caracterización y reactividades han sido descritas en detalles por Vázquez A. M. y colaboradores (Hybridoma 11, pág. 245-256, 1992). El hibridoma productor de dichos anticuerpos monoclonales ha sido
15 depositado bajo las regulaciones del Tratado de Budapest a los fines de la presente solicitud de patente (No. de depósito pendiente de recibir).

2. Purificación de los AcMs.

Estos anticuerpos son purificados a partir de Líquido Ascítico Murino (LAM). El LAM se filtra por un filtro de Policarbonato (Sartorius) con 50 mm
20 de diámetro, después se pasa por un prefiltro (Filtro de Fibras de Cristal) para la remoción de partículas gruesas y posteriormente se filtra a través de membranas de acetato de celulosa de 0.8 µm y 0.45 µm.

El LAM se diluye con igual volumen de Tampon Glicina 1.5 M, NaCl 3M pH 8.9 y para la purificación se utiliza una columna XK 26/20 (área 5.3
25 cm²) empacada con 50 ml de gel de Proteína A sepharosa 4 Fast Flow y se aplica igual volumen de la muestra que de Tampon a eluir a 80 cm/h (7 ml/min).

La columna se equilibra previamente con al menos 5 volúmenes de lecho. Después de la aplicación la columna se lava con 5-10 volúmenes de lecho de
30 gel del tampon anterior. La elución se realiza con Tampón Citrato (Ácido

Cítrico) 0.1 M pH 6.0 a una velocidad de 60 cm/h (5.3 ml/min) y la columna se regenera con Tampón Citrato 0.1 M pH 3.0 a una velocidad de 80 cm/h.

La fracción eluida se pasa por una columna XK 50/30 empacada con sephadex G-25 M en tampón fosfato salino (PBS) y la fracción de proteína 5 eluida de este paso se filtra en condiciones asépticas bajo un flujo laminar con una membrana de 0.22 µm.

Por último las fracciones recolectadas de 8 batch diferentes se mezclan y se concentran en cartuchos de hemodiálisis hasta que la concentración de los AcMs alcanza un valor de 5 mg/ml medida por mediciones de densidad óptica (DO) a 280 nm. A los purificados se le realizan los controles de calidad siguientes: concentración de proteínas por Método Lowry, concentración de proteínas por DO a 280 nm, actividad biológica por método ELISA de competencia, electroforesis (pureza), focalización isoeléctrica (punto isoeléctrico) y se mide la estabilidad de los AcMs.

15 **3. Obtención de Anticuerpos Monoclonales Químéricos.**

- **Clonaje de la Secuencia Molecular:**

Las cadenas VH y VK fueron amplificadas por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos. El DNA complementario (cDNA) purificado de las cadenas VH y VK fue clonado 20 en el vector M13. Doce clones independientes fueron secuenciados por el método del dideoxido utilizando T7 DNA Pol (Pharmacia). La secuencias de VH y VK tienen alta relación con el subgrupo 2 de Kabat.

- **Construcción de los genes químéricos:**

Se reamplifica el cDNA por PCR utilizando oligonucleótidos específicos. 25 Los cDNA amplificados fueron digeridos con PstI y BstEII para el gen de VH y con Pvull y Bg1II para el gen de VK. Los fragmentos se clonaron en el vector M13-VHPCR1 (digeridos con PstI y BstEII) o en el vector M13-VKPCR1 (digerido con Pvull y Bc1I). Los detalles de los vectores son referidos en Orlandi, R. y colaboradores (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837, 1989). El M13VHPCR-C5 y M13VKPCR-C5 que contienen los insertos 30 de los genes V fueron identificados directamente por la secuenciación.

El gen VH conjuntamente con el promotor de la cadena pesada de la Ig y los sitios apropiados del DNA splicing y la secuencia del péptido señal fueron cortados de los vectores M13 por digestión con HindIII y BamHI y clonados en un vector de expresión (pSVgpt). Entonces la región constante de la IgG1 humana (Takahashi, N. et al. Cell 29:718-749, 1982) fue adicionada como un fragmento BamHI. La construcción resultante fue C5VH-pSVgpt. La construcción de C5VK-pSVhyg fue esencialmente la misma excepto que el gen gpt fue reemplazado por el gen de resistencia a la higromicina y se adicionó la región constante de la cadena Kappa humana (Heiter, P. A. et al,
5 Cell 22:197-207, 1980)

- Expresión del vector químérico y el humanizado en células NSO.

Las células NSO fueron electroporadas con 4 µg de la región gamma 1 del vector químérico C5VH-CMMAR y 8 µg de la región constante kappa del químérico C5VK-CMMARhyg, fueron liberalizados por digestión con PVUI.
15 Los DNA fueron mezclados, precipitados en etanol y disueltos en 25 µl de agua. Aproximadamente 10^7 células NSO fueron crecidas hasta la semiconfluencia, obtenidas por centrifugación y resuspendidas en 0.5 ml DMEN conjuntamente con el DNA digerido en una cubeta de electroporación. Después de 5 minutos en hielo, a las células se les aplicó
20 un pulso de 170 volts y 960 µF (Gene-Pulser, Bio-Rad) y se dejan en hielo por 30 minutos. Las células fueron colocadas en 20 ml DMEN más 10 % suero fetal bovino y se dejan a que se recobren por 48 horas. Después las células fueron distribuidas placas de 96 pozos y se les aplicó medio selectivo (DMEN, 10 % suero fetal bovino, 0.8 µg/ml de ácido micofenólico, 250 µg/ml
25 de xantina). Los clones transfectados se detectaron visualmente 14 días después. La presencia de los anticuerpos químéricos y humanizados en el medio de los pozos que contienen los clones transfectados fue medida por ELISA. Las placas de Microtitulos de 96 pozos para ELISA fueron recubiertas con el conjugado goat anti-human IgG, cadena gamma específica (Sera Lab). Después de lavarse con PBST (phosphate buffered saline que contiene 0.02 % tween 20, pH 7.5), 20 µl de medio de cultivo de
30

las placas que contienen los transfectomas se le adicionaron a cada pozo de la placa de microtítulos 1 hora a 37°C.

Después las placas se lavan con PBST y se adiciona el conjugado con peroxidasa goat anti-human Kappa, cadena ligera específica (Sera-Lab) y se 5 incuba a 37°C durante 1 hora. Se bota el contenido de los pozos y éstos se lavan con PBST y se adiciona el buffer sustrato que contiene o-phenylenediamine. La reacciones fueron detenidas después de unos minutos añadiendo ácido sulfúrico y se midió la absorbancia a 492 nm.

10 **4. Obtención y utilización de una composición radiomarcada para el diagnóstico y/o terapia de tumores colorectales.**

La obtención de la composición radiomarcada de la presente invención se obtiene utilizando la siguiente metodología :

Los anticuerpos ior C5 concentrados por ultrafiltración en Centricon-30 (Amicon, MA) en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4 son reducidos por el 15 método descrito en la Solicitud de Patente Europea EP No. 0 271 806 A2, a través de una reducción con 2-mercaptoetanol (2-ME) a una relación molar en exceso de 2000:1 (2-ME : AcMs) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los anticuerpos reducidos fueron purificados para eliminar el exceso de 2-ME usando una columna Sephadex G-25 M (Pharmacia Biotech, 20 Suecia) y PBS pH 7.4 burbujeado con nitrógeno como fase móvil. Se colectaron fracciones de 2 ml y la concentración de los anticuerpos reducidos se determinó por mediciones de densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Ultrospec, Pharmacia, Suecia). La concentración de la proteína resultó ser de 2.5-5.0 en el pico.

25 Alicuotas de 1-10 mg de los anticuerpos reducidos se dispensaron en viales de 10 ml y se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido. Después se reconstituyó el Kit MDP comercial Amerscan Medronate II (Amersham, UK, que contiene 5 mg de ácido medrónico, 0.34 mg de fluoruro estanooso y 2 mg sodium p-aminobenzoate) con 5 ml de solución salina 30 burbujeada con nitrógeno. 50-100 µl de esta solución se añadieron por cada 1 mg de los anticuerpos reducidos para dar una concentración de MDP,

fluoruro estañoso y ácido p-aminobenzoico de 50-100, 3.4-6.8 y 20-40 µg por mg de anticuerpos respectivamente. La solución con los AcMs reducidos y el ligando débil se congela en nitrógeno líquido de nuevo y los productos congelados se liofilizaron por 24 horas, sellados al vacío y se guardan a 4°C

5 hasta su uso.

La composición objeto de la presente invención comprende dos componentes básicos:

1. Los anticuerpos monoclonales ior C5, sus variantes químéricas o humanizadas, fragmentos y/o derivados de éstos.
- 10 2. Un agente reductor capaz de reducir al Tc-99m de Tc (7⁺) a Tc(5⁺), Tc(4⁺) y un acomplejante débil para realizar el intercambio del Tc-99m con el anticuerpo.

Las ventajas fundamentales de la composición de acuerdo con la invención es que entre sus componentes incluye un agente reductor para reducir al Tc-99m del estado de oxidación 7+ a los estados de oxidación 5+, 15 4+ y 3+, los cuales son fisiológicamente aceptables y el uso puede ser llevado a cabo con un proceso de intercambio con un ligando débil para unir el Tc-99m o sus análogos a la preparación de anticuerpo deseada.

El Tc-99m debe ser adicionado a la composición por el usuario previo a la administración a humanos. La utilización del Tc-99m ofrece imágenes excelentes por inmunogammagrafía. El Tc-99m se retiene por los AcMs por un mecanismo de quelatos y el radiofármaco se forma bajo condiciones de reducción para minimizar o prevenir la reacción irreversible a través de la cual el Tc-99m se separa de los AcMs. El Tc-99m se puede obtener como pertecnetato sódico desde un generador convencional de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc. Cualquier fuente de Tc-99m con calidad farmacéutica puede ser utilizado en la presente invención.

5. Obtención de la composición farmacéutica.

La composición farmacéutica de la presente invención se obtiene 30 utilizando la siguiente metodología :

Los anticuerpos ior C5 concentrados por ultrafiltración en Centricon-30 (Amicon, MA) en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4 fue reducido por el método descrito (Schwarz y Steinstrasse, 1987 y modificado por Mather y Ellison, 1990) a través de una reducción con 2-mercaptoetanol (2-ME) a una relación molar en exceso de 2000:1 (2-ME : AcMs) a temperatura ambiente durante 30 minutos. El anticuerpo reducido se purificó para eliminar el exceso de 2-ME usando una columna Sephadex G-25 M (Pharmacia Biotech, Suecia) y PBS pH 7.4 burbujeado con nitrógeno como fase móvil. Se colectaron fracciones de 2 ml y la concentración del anticuerpo reducido se determinó por mediciones de densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Ultrospec, Pharmacia, Suecia). La concentración de la proteína resultó ser de 2.5-5.0 en el pico.

Alicuotas de 1-10 mg de los anticuerpos reducidos se dispensaron en viales de 10 ml y se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido. 15 Después se reconstituyó el Kit MDP comercial Amerscan Medronate II (Amersham, UK, que contiene 5 mg de ácido medrónico, 0.34 mg de fluoruro estañoso y 2 mg sodium p-aminobenzoate) con 5 ml de solución salina burbujeada con nitrógeno, 50-100 µl de esta solución se añadieron por cada 1 mg de anticuerpos reducidos para dar una concentración de MDP, 20 fluoruro estañoso y ácido p-aminobenzoico de 50, 3.4 y 20 µg por mg de anticuerpos respectivamente.

Esta solución que contiene los AcMs reducidos y el ligando débil se utiliza en forma liofilizada o se prepara al instante, y para el radiomarcaje se reconstituye con 0.1-100 mCi (3.7- 3700 MBq) de $^{99m}\text{TcO}_4$ (por cada mg de 25 AcMs) como eluato del generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Elumatic II Amersham, UK) y se espera durante 15 minutos a temperatura ambiente para alcanzar una alta eficiencia de marcaje.

Control de la Calidad de Radiomarcaje.

El control de calidad se realiza por cromatografía de papel ascendente 30 (Whatman 3 MM)

6. Radiomarcaje de Fragmentos.

Los fragmentos F(ab')2 de los AcMs también pueden ser marcados por el método descrito anteriormente. El fragmento F(ab')2 se obtiene por digestión 5 de los AcMs con pepsina seguido de una purificación cromatográfica que separa los fragmentos F(ab')2 del resto de los subproductos de la digestión con pepsina.

Posterior al paso de purificación se realiza el proceso de reducción de los puentes disulfuro en el fragmento según el método descrito anteriormente, 10 se realiza el paso de purificación por una columna de filtración en gel PD-10 Sephadex G-25 M para eliminar el exceso de 2-ME, se determina la concentración de los fragmentos reducidos por mediciones de densidad óptica a 280 nm como se describe arriba, se determinan los números de grupos sulfidrilos por molécula de fragmento, se le añade la solución de 15 reducción del pertecnetato y por último se le adiciona la cantidad deseada de pertecnetato sódico.

7. Determinación de la inmunorreactividad de los AcMs reducidos.

En la presente invención se utiliza un sistema ELISA de competencia con el antígeno y se comparan los AcMs nativos (no reducidos) y los reducidos 20 utilizando curvas patrones con concentraciones decrecientes de los AcMs. Se calculan las constantes de afinidad para las concentraciones correspondiente al 50 % de inhibición y se determina si son similares las afinidades entre los AcMs nativos y los reducidos.

Por este método se determina que el proceso de reducción de los 25 anticuerpos y sus fragmentos con 2-ME, seguido de la purificación a través de una columna de filtración en gel PD-10 sephadex G-25 M, no afecta la inmunorreactividad de los anticuerpos y sus fragmentos, ni su reconocimiento por el antígeno, ni provoca cambios estructurales en la integridad de la molécula.

8. Monitoreo de la composición farmacéutica.

La unión selectiva de la composición farmacéutica a las células tumorales de colon y recto, metástasis y recidivas que expresan el antígeno ior C2, una vez administrada por vía endovenosa a humanos se monitorea por métodos 5 inmunogammagráficos a través de una cámara gamma.

Se realizan imágenes planas con vista anterior y posterior de la cabeza, tórax, hígado y pelvis con ayuda de una cámara gamma. Se realizan adquisiciones a 1, 2, 3, 5 y 24 horas, utilizando una estadística de 700 000 conteos por adquisición. Las imágenes se guardan en la computadora en 10 una matrix de 128x128 para su posterior utilización.

La acumulación de los AcMs ior C5 en las células tumorales se determina por estas imágenes inmunogammagráficas con vistas planas anteriores y posteriores.

9. Monitoreo de la biodistribución de la composición.

15 La biodistribución en órganos normales de la composición de la presente invención se monitorea a través de imágenes de cuerpo completo que se obtienen utilizando una Cámara Gamma ajustada con colimador de energía media de alta resolución para incrementar las vistas laterales. Las imágenes se adquieren utilizando una ventana de 20 % centrada en 140 Kev que es la 20 energía de emisión del Tc-99m.

Se adquieren imágenes de cuerpo completo con vistas anteriores y posteriores a los 10 minutos, 1, 3, 5 y 24 horas después de administrado el radiofármaco utilizando el gantry a una velocidad de 20 cm/min. Los tiempos de adquisición son de aproximadamente entre 20-25 minutos cada 25 uno.

Las imágenes de cuerpo completo se graban en una computadora en matrix de 512x2048 para su posterior procesamiento.

La invención se describe con más detalles por medio de los siguientes 30 ejemplos.

EJEMPLO 1: Preparación de los anticuerpos monoclonales ior C5.

Los anticuerpos monoclonales ior son anticuerpos de origen murino de isotipo IgG1, los cuales fueron obtenidos mediante la inmunización de ratones Balb/c con la linea celular de cultivo humana SW1116 (adenocarcinoma colorrectal) y la fusión de los esplenocitos del ratón seleccionado con la linea de mieloma murino no secretora SP 2/O Ag14 y se purificaron por cromatografía de afinidad en Proteina A sepharosa 4 Fast Flow.

El hibridoma productor de dichos anticuerpos monoclonales ha sido depositado bajo las regulaciones del Tratado de Budapest a los fines de la presente solicitud de patente (No. de depósito pendiente de recibir).

EJEMPLO 2. Obtención de los Anticuerpos Monoclonales Químéricos.**- Clonaje de la Secuencia Molecular:**

Las cadenas VH y VK fueron amplificadas por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos. El DNA complementario (cDNA) purificado de las cadenas VH y VK fue clonado en el vector M13. Doce clones independientes fueron secuenciados por el método del dideoxido utilizando T7 DNA Pol (Pharmacia). La secuencias de VH y VK tienen alta relación con el subgrupo 2 de Kabat.

- Construcción de los genes químéricos:

Se reamplifica el cDNA por PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Los cDNA amplificados fueron digeridos con PstI y BstEII para el gen de VH y con Pvull y BgIII para el gen de VK. Los fragmentos se clonaron en el vector M13-VHPCR1 (digeridos con PstI y BstEII) o en el vector M13-VKPCR1 (digerido con Pvull y Bc1I). Los detalles de los vectores (Orlandi, R et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837, 1989). El M13VHPCR-C5 y M13VKPCR-C5 que contienen los insertos de los genes V fueron identificados directamente por la secuenciación.

El gen VH conjuntamente con el promotor de la cadena pesada de la Ig y los sitios apropiados del DNA splicing y la secuencia del péptido señal

fueron cortados de los vectores M13 por digestión con HindIII y BamHI y clonados en un vector de expresión (pSVgpt). Entonces la región constante de la IgG1 humana (Takahashi, N. et al. Cell 29:718-749, 1982) fue adicionada como un fragmento BamHI. La construcción resultante fue 5 C5VH-pSVgpt. La construcción de C5VK-pSVhyg fue esencialmente la misma excepto que el gen gpt fue reemplazado por el gen de resistencia a la higromicina y se adicionó la región constante de la cadena Kappa humana (Heiter, P. A. et al, Cell 22:197-207, 1980)

- **Expresión del vector químérico y el humanizado en células NSO.**

10 Las células NSO fueron electroporadas con 4-8 µg de la región gamma 1 del vector químérico C5VH-CMMAR y 8-16 µg de la región constante kappa del químérico C5VK-CMMARhyg, fueron liberalizados por digestión con PVUI. Los DNA fueron mezclados, precipitados en etanol y disueltos en 25 µl de agua. Aproximadamente 10^7 células NSO fueron crecidas hasta la 15 semiconfluencia, obtenidas por centrifugación y resuspendidas en 0.5-1.0 ml DMEN conjuntamente con el DNA digerido en una cubeta de electroporación. Después de 5 minutos en hielo, a las células se les aplicó un pulso de 170 volts y 960 µF (Gene-Pulser, Bio-Rad) y se dejan en hielo por 30 minutos. Las células fueron colocadas en 20 ml DMEN más 10 % 20 suero fetal bovino y se dejan a que se recobren por 48 horas. Después las células fueron distribuidas placas de 96 pozos y se les aplicó medio selectivo (DMEN, 10 % suero fetal bovino, 0.8 µg/ml de ácido micofenólico, 250 µg/ml de xanthine). Los clones transfectados se detectaron visualmente 14 días después. La presencia de los anticuerpos químéricos y humanizados en el 25 medio de los pozos que contienen los clones transfectados fue medida por ELISA. Las placas de Microtítulos de 96 pozos para ELISA fueron recubiertas con el conjugado goat anti-human IgG, cadena gamma específica (Sera Lab). Después de lavarse con PBST (phosphate buffered saline) que contiene 0.02 % tween 20, pH 7.5), 20 µl de medio de cultivo de 30 las placas que contienen los transfectomas se le adicionaron a cada pozo de la placa de microtítulos 1 hora a 37°C.

Después las placas se lavan con PBST y se adiciona el conjugado con peroxidasa goat anti-human Kappa, cadena ligera específica (Sera-Lab) y se incuba a 37°C durante 1 hora. Se bota el contenido de los pozos y éstos se lavan con PBST y se adiciona el buffer sustrato que contiene o-phenylenediamine. La reacciones fueron detenidas después de unos minutos añadiendo ácido sulfúrico y se midió la absorbancia a 492 nm.

EJEMPLO 3 : Proceso de obtención de una composición radiomarcada por el método directo de marcaje.

10 Los anticuerpos ior C5 obtenidos según el procedimiento del Ejemplo 1 fueron reducidos en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4 (Solicitud de Patente Europea No. 0 271 806 A2) a través de una reducción con 2-mercptoetanol (2-ME) a una relación molar en exceso de 2000:1 (2-ME : AcMs) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los anticuerpos reducidos se
15 purificaron para eliminar el exceso de 2-ME usando una columna Sephadex G-25 M (Pharmacia Biotech, Suecia) y PBS pH 7.4 burbujeado con nitrógeno como fase móvil. Se colectaron fracciones de 2 ml y la concentración de dichos anticuerpos reducidos se determinó por mediciones de densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Ultrospec, Pharmacia,
20 Suecia). La concentración de la proteína resultó ser de 2.5-5.0 en el pico.

Alicuotas de 1-10 mg de los anticuerpos reducidos se dispensaron en viales de 10 ml y se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido. Después se reconstituyó el Kit MDP comercial Amerscan Medronate II (Amersham, UK, que contiene 5 mg de ácido medrónico, 0.34 mg de fluoruro 25 estañoso y 2 mg sodium p-aminobenzoate) con 5 ml de solución salina burbujeada con nitrógeno, 50-100 µl de esta solución se añadieron por cada 1 mg de anticuerpos reducidos para dar una concentración de MDP, fluoruro estañoso y ácido p-aminobenzoico de 50-100, 3.4-6.8 y 20-40 µg por mg de anticuerpos respectivamente: La solución con los AcMs reducidos 30 y el ligando débil se congela en nitrógeno líquido de nuevo y los productos

congelados se liofilizaron por 24 horas, sellados al vacío y se guardan a 4°C hasta su uso.

EJEMPLO 4 : Obtención de la composición farmacéutica.

5 La composición farmacéutica de la presente invención se obtiene utilizando la siguiente metodología :

Los anticuerpos ior C5 obtenidos según el procedimiento del Ejemplo 1 se redujeron en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4 (Solicitud de Patente Europea No. 0 271 806 A2) a través de una reducción con 2-mercaptoetanol (2-ME) a una relación molar en exceso de 2000:1 (2-ME : AcMs), a temperatura ambiente durante 30 minutos. El anticuerpo reducido se purificó para eliminar el exceso de 2-ME usando una columna Sephadex G-10 15 M (Pharmacia Biotech, Suecia) y PBS pH 7.4 burbujeado con nitrógeno como fase móvil. Se colectaron fracciones de 2 ml y la concentración del anticuerpo reducido se determinó por mediciones de densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Ultrospec, Pharmacia, Suecia). La concentración de la proteína resultó ser de 2.5-5.0 en el pico.

Alicuotas de 1-10 mg de los anticuerpos reducidos se dispensaron en viales de 10 ml y se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido. 20 Después se reconstituyó el Kit MDP comercial Amerscan Medronate II (Amersham, UK, que contiene 5 mg de ácido medrónico, 0.34 mg de fluoruro estañoso y 2 mg sodium p-aminobenzoate) con 5 ml de solución salina burbujeada con nitrógeno, 50-100 µl de esta solución se añadieron por cada 1 mg de anticuerpo reducido para dar una concentración de MDP, fluoruro 25 estañoso y ácido p-aminobenzoico de 50-100, 3.4-6.8 y 20-40 µg por mg de anticuerpos respectivamente.

Esta solución que contiene los AcMs reducidos y el ligando débil se utiliza en forma liofilizada o se prepara al instante, y para el radiomarcaje se reconstituye con 0.1-100 mCi (3.7- 3700 MBq) de $^{99m}\text{TcO}_4$ (por cada mg de 30 AcMs) como eluato del generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Elumatic II Amersham, UK)

y se espera durante 15 minutos a temperatura ambiente para alcanzar una alta eficiencia de marcaje.

EJEMPLO 5 : Radiomarcaje de fragmentos F(ab')2 del AcM ior C5.

5 El fragmento F(ab')2 se obtuvo por digestión del AcM con pepsina seguido de una purificación cromatográfica que separó los fragmentos F(ab')2 del resto de los subproductos de la digestión con pepsina y la pureza que se obtuvo después de la purificación fue mayor del 95 %.

10 El método descrito en el Ejemplo 3 se empleó para la reducción de los puentes disulfuro en el fragmento, donde además se incluyó el paso de purificación usando la columna de filtración en gel PD-10 Sephadex G-25 M y la solución de reducción del pertecnetato.

**EJEMPLO 6 : Determinación de la inmunorreactividad de los AcMs
15 reducidos.**

Este ejemplo ilustra que en la presente invención usando el 2-ME como agente reductor del ejemplo 2 seguido de la purificación a través de una columna de filtración en gel PD-10 sephadex G-25 M, no se afecta la inmunorreactividad de los AcMs.

20 Se utilizó un sistema ELISA de competencia con el antígeno y se compararon los AcMs nativos (no reducidos) y los reducidos utilizando curvas patrones con concentraciones decrecientes de los AcMs. Se calcularon las constantes de afinidad para la concentración correspondiente al 50 % de inhibición y se encontró que eran similares entre el AcMs nativos
25 y los reducidos.

EJEMPLO 7 : Unión de los anticuerpos ior C5 marcados con Tc-99m a las células de cáncer colorrectal.

Las imágenes planas con vista anterior y posterior de la cabeza, tórax,
30 hígado y pelvis fueron realizadas en una cámara gamma. Imágenes a la 1, 2,

3, 5 y 24 horas fueron adquiridas utilizando una estadística de 700 000 conteos por adquisición.

Las imágenes fueron guardadas en la computadora en una matrix de 128x128 para su posterior utilización. La acumulación de los AcMs ior C5 en las células tumorales se determinó por estas imágenes inmunogammagráficas con vistas planas anteriores y posteriores. Las imágenes adquiridas en los intervalos de tiempos antes mencionados muestran claramente como con los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden ser detectados durante las primeras tres horas después de administrado el radiofármaco tumores en el colon ascendente, colon descendente y en el canal anal, así como metástasis hepáticas y en ángulo esplénico, lesiones no vistas antes por otros métodos imageneológicos como los Rayos X, el Ultrasonido, la Tomografía Axial Computadorizada (CAT Scans) y la Resonancia Magnética Nuclear (NMR). La gran selectividad de estos anticuerpos por los tumores colorrectales, sus metástasis y recidivas propicia que a las 24 hrs después de administrado el radiofármaco en las lesiones se localizan entre un 1 y 3 % de la dosis inyectada por cada 100 g de tumor.

20 EJEMPLO 8 : Biodistribución en órganos normales de los anticuerpos ior C5 marcado con Tc-99m.

Imagenes de cuerpo completo fueron obtenidas usando una Cámara Gamma ajustada con colimador de energía media de alta resolución para incrementar las vistas laterales. Las imágenes fueron adquiridas utilizando una ventana de 20 % centrada en 140 Kev que es la energía de emisión del Tc-99m. Imágenes de cuerpo completo anterior y posterior fueron adquiridas a los 10 minutos, 1, 3, 5 y 24 horas después de administrado el radiofármaco utilizando el gantry a una velocidad de 20 cm/min. Los tiempos de adquisición fueron aproximadamente de 25 minutos cada uno. 30 Las imágenes de cuerpo completo fueron grabadas en una computadora en matrix de 512x2048 para su posterior procesamiento.

Con ayuda de regiones de interés que se dibujaron sobre los principales órganos fuentes se determinaron los patrones de biodistribución en órganos normales, los cuales mostraron que durante las primeras 5 horas después de administrado el radiofármaco la mayor parte de la actividad se encuentra 5 en el torrente sanguíneo y en los órganos parenquimatosos. Sólo un bajo porcentaje de la actividad se excreta en las primeras horas por orina.

Entre las 1 y 5 horas se observó buen contraste en los pulmones, el hígado y los riñones, así como disminución de la perfusión de los músculos periféricos, aunque la actividad en el torrente sanguíneo continuó elevada.

10 Las imágenes tomadas a las 24 horas después de la inyección muestran una actividad baja en sangre y en el cuerpo completo (Tabla 1).

Tabla 1: Biodistribución en órganos normales de los AcMs ior C5 marcados con Tc-99m.

Órgano Fuente	% de la Dosis Inyectada				
	10 min	1 hr	3 hr	5 hr	24 hr
Corazón	7.9	6.8	4.5	3.8	0.3
Hígado	9.4	8.3	6.0	5.3	0.6
Bazo	1.4	1.2	0.5	0.7	0
Riñones	3.7	3.6	2.4	2.6	0.2
Vejiga	0.5	0.4	0.4	0.8	0.0
Pulmones	4.0	3.5	2.3	2.05	0.1
Resto Cuerpo	67.9	58.8	48.0	38.5	1.0
Cuerpo Entero	100	87.0	67.7	56.5	2.6

5 Con estos datos obtenidos en estudios "in vivo" se demuestra que el patrón de biodistribución del antígeno C2 observado en humanos con la composición de la presente invención es diferente al reportado en estudios anteriores empleando los anticuerpos monoclonales ior C5 (Vázquez A. M. et al, Year Immunol., Basel, Karger, vol. 7, pág. 137-145, 1993). En estos 10 estudios se había observado la presencia de dicho antígeno tanto en células normales como en células malignas. Con el empleo de la composición de la presente invención se logra una distinción selectiva de las células afectadas en relación a las células normales, ya que sólo son radiomarcadas las células malignas lo que hace presumir una localización intracitoplasmática 15 de dicho antígeno en las células normales y superficial en el caso de las células malignas. Este hallazgo hace a la presente solución técnica muy útil para su utilización en métodos de detección inmunogammagráficos.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpos monoclonales que reconocen el antígeno ior C2 presente en tumores malignos de colon y recto, epitopes similares al mismo, mezcla de éstos o cualesquiera antígeno tumor asociado relacionado con dicho antígeno caracterizados por ser útiles en el diagnóstico y/o tratamiento de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas.
2. Anticuerpos monoclonales según la reivindicación 1 caracterizados porque son los anticuerpos monoclonales murinos C5 así como cualquier variante humanizada o químérica obtenida a partir de ellos.
3. Anticuerpos monoclonales según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizados porque los anticuerpos monoclonales murinos C5 son obtenidos a partir del hibridoma de igual nombre (Número de Depósito pendiente).
4. Anticuerpos monoclonales según la reivindicación 1 caracterizado porque son anticuerpos antiidiotípico generados por los anticuerpos monoclonales de la reivindicación 2.
5. Anticuerpos monoclonales según la reivindicación 1 caracterizado porque son anticuerpos anti-antiidiotípico que reconocen al antígeno ior C2.
6. Uso de los anticuerpos de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la fabricación de una composición farmacéutica útil en el tratamiento tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas.
7. Uso de los anticuerpos de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la fabricación de una composición útil para la localización e identificación "in vivo" de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas.
8. Composición farmacéutica para el tratamiento de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas caracterizada porque

contiene uno de los anticuerpos monoclonales de las reivindicaciones de la 1 a la 5 y un excipiente apropiado para su aplicación.

9. Composición según la reivindicación 8 caracterizada porque contiene fragmentos de dichos anticuerpos u otras transformaciones obtenibles a partir de los mismos.
5
10. Composición para la localización e identificación "in vivo" de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas caracterizada porque contiene uno de los anticuerpos monoclonales de las reivindicaciones de la 1 a la 5.
11. Composición según la reivindicación 10 caracterizada porque contiene además compuestos para el radiomarcaje de dichos anticuerpos, los cuales se mezclan con los mismos para producir una solución acuosa administrable.
10
12. Composición según la reivindicación 11, caracterizada porque los radiomarcadores pueden ser el tecnecio 99, el renio 186, el renio 188 o sus análogos.
15
13. Método diagnóstico para la detección de tumores malignos de colon, sus metástasis y recidivas "in vivo" caracterizado por la administración de una composición fisiológicamente aceptable que contiene cualquiera de los anticuerpos de la reivindicaciones de la 1 a la 5 los cuales han sido previamente marcados con Tc-99m o sus análogos y el monitoreo de la biodistribución de dicha composición por métodos de inmunogammagrafía.
20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/CU 97/00002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 6	C07K16/30	A61K39/395	A61K51/10	G01N33/574	G01N33/577
	C07K16/46				

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>INMUNOLOGIA, vol. 14, no. 3, 1995, BARCELONA, SPAIN, pages 130-132, XP000677241 A. VAZQUEZ ET AL.: "Characterization of ior C5 colorectal tumor associated antigen." see the whole document</p> <p>---</p>	1-13
X	<p>HYBRIDOMA, vol. 11, no. 2, April 1992, NEW YORK, NY, USA, pages 245-256, XP000676469 A. VAZQUEZ ET AL.: "Characterization of the colorectal antigen IOR-C2." cited in the application see the whole document</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-13

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search

21 August 1997

Date of mailing of the international search report

29.08.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CU 97/00002

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YEAR IN IMMUNOLOGY, vol. 7, 1993, BASEL, SWITZERLAND, pages 137-145, XP000676470 A. VAZQUEZ ET AL.: "Characterization of the colorectal antigen IOR C2.II." cited in the application see the whole document ---	1-13
X	BIOTECNOLOGIA APLICADA, vol. 8, no. 2, 1991, HAVANA, CUBA, pages 206-215, XP000676466 B. TORMO ET AL.: "Colon cancer associated antigen expression on normal and neoplastic human tissues detected by IORC2: A novel monoclonal antibody." cited in the application see the whole document ---	1-13
X	BIOTECNOLOGIA APLICADA, vol. 10, no. 2, 1993, HAVANA, CUBA, pages 77-78, XP000677242 A. VAZQUEZ ET AL.: "Characterization of monoclonal antibodies against colorectal cancer." see the whole document ---	1-13
A	NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY, vol. 21, no. 7, 1994, OXFORD, GB, pages 1013-1016, XP000676463 G. FERRO-FLORES ET AL.: "A freeze-dried kit formulation for the preparation of 99mTc-EHDP-MoAb-IOR CEA1 complex." see abstract ---	7,10-13
A	WO 90 06323 A (CENTOCOR, INC.) 14 June 1990 see the whole document -----	6-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

1. International application No.

PCT/CU 97/00002

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 13
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claim 13 is directed to a method (as far as an in vivo method is concerned), practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 4, 5
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
Anti-idiotypic monoclonal antibodies as claimed in claims 4 and 5 are supposed to react with both antigen i or C2 and with monoclonal antibodies anti-antigen i or C2. This appears to be contradictory. Assumed was that anti-idiotypic monoclonal antibodies were meant which are reactive with
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

a monoclonal antibody anti-antigen 1 or C2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/CU 97/00002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9006323 A	14-06-90	NONE	